

REC'D 29 OCT 1999

WIPO

PCT

PCT/JP 99/04130

20

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

4

10.09.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 7月31日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第218093号

出 願 人

Applicant (s):

杉山 治夫

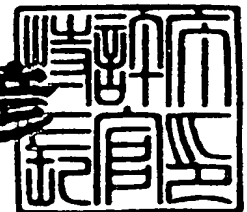
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月15日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-306938

【書類名】 特許願

【整理番号】 983279

【提出日】 平成10年 7月31日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 C07K 7/06
A61K 38/04

【発明の名称】 癌抑制遺伝子WT 1の産物に基づく癌抗原

【請求項の数】 7

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府富田林市高辺台3-4-4 2-202

 【氏名】 岡 芳弘

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西2-19-30

 【氏名】 杉山 治夫

【特許出願人】

 【識別番号】 595090392

 【氏名又は名称】 杉山 治夫

【代理人】

 【識別番号】 100077517

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 石田 敬

 【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

 【識別番号】 100087871

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

 【識別番号】 100088269

 【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 癌抑制遺伝子WT1の産物に基づく癌抗原

【特許請求の範囲】

【請求項1】 癌抑制遺伝子WT1の産物又はその部分ペプチドを活性成分とする癌抗原。

【請求項2】 配列番号：1のアミノ酸配列において、Phe, Tyr, Leu, Met, Asn及びIleから選択される少なくとも1個のアンカーアミノ酸を含む、連続する7～30個のアミノ酸からなるペプチド、又は配列番号：2のアミノ酸配列において、Met, Leu及びValから選択される少なくとも1個のアンカーアミノ酸を含む、連続する7～30個のアミノ酸から成るペプチド、を活性成分とする請求項1に記載の癌抗原。

【請求項3】 前記抗原が、癌抑制遺伝子WT1の高発現をもたらす癌の抗原である、請求項1又は2に記載の癌抗原。

【請求項4】 前記癌が、白血病、骨髓異形成症候群、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌又は卵巣癌である、請求項1又は2に記載の癌抗原。

【請求項5】 前記ペプチドが、

K^b₄₅ Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu (配列番号：3)

K^b₃₃₀ Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu (配列番号：4)

D^b₁₂₆ Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：5)

D^b₂₂₁ Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met (配列番号：6)

D^b₂₃₅ Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：7)

WH₁₈₇ Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (配列番号：8)

のいずれかである、請求項1～4のいずれかに記載の癌抗原。

【請求項6】 前記ペプチドが、

D^b₁₂₆ Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：5)、又は

WH₁₈₇ Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (配列番号：8)

である、請求項5に記載の癌抗原。

【請求項7】 請求項1～6のいずれか1項に記載の癌抗原を含んで成る癌

ワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、Wilms 腫瘍の癌抑制遺伝子WT1 の産物に基づく癌抗原に関する。この癌抗原は、白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、悪性リンパ腫などの血液の癌、又は固形癌、例えば胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等、並びにさらにはWT1 を発現するすべての癌に対する抗癌ワクチンとして有用である。

【0002】

【従来の技術】

異物を排除するための免疫機構には、一般に、抗原を認識して抗原提示細胞として機能するマクロファージ、該マクロファージの抗原提示を認識して種々のリンホカインを産生して他のTー細胞等を活性化するヘルパーTー細胞、該リンホカインの作用により抗体産生細胞に分化するBーリンパ球等が関与する液性免疫と、抗原の提示を受けて分化したキラーTー細胞が標的細胞を攻撃し破壊する細胞性免疫とがある。

【0003】

現在のところ、癌の免疫は主として、キラーTー細胞が関与する細胞性免疫によるものと考えられている。キラーTー細胞による癌免疫においては、主要組織適合抗原 (Major Histocompatibility Complex ; MHC) クラスI と癌抗原との複合体の形で提示された癌抗原を認識した前駆体Tー細胞が分化増殖して生成したキラーTー細胞が癌細胞を攻撃し、破壊する。この際、癌細胞はMHCクラスI 抗原と癌抗原との複合体をその細胞表面に提示しており、これがキラーTー細胞の標的とされる (Cur. Opin, Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin, Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev., 146, 167, 1995)。

【0004】

標的細胞である癌細胞上にMHCクラスI 抗原により提示される前記の癌抗原は、癌細胞内で合成された抗原蛋白質が細胞内プロテアーゼによりプロセッシング

されて生成した約8～12個のアミノ酸から成るペプチドであると考えられている (Cur. Opin. Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin. Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev., 146, 167, 1995)。

現在、種々の癌について抗原蛋白質の検索が行われているが、癌特異抗原として証明されているものは少ない。

【0005】

Wilms腫瘍の癌抑制遺伝子WT1 (WT1遺伝子) は、Wilms腫瘍、無紅彩、泌尿生殖器異常、精神発達遅滞などを合併するWAGR症候群の解析からWilms腫瘍の原因遺伝子の1つとして染色体11p13から単離された (Gessler, M. ら、Nature, Vol. 343, p.774-778 (1990)) ものであり、ゲノムDNAは約50kbで10のエキソンから成り、そのcDNAは約3kbである。cDNAから推定されるアミノ酸配列は、配列番号: 1に示す通りである (Mol. Cell Biol., 11, 1707, 1991)。

【0006】

WT1遺伝子はヒト白血病で高発現しており、白血病細胞をWT1アンチセンスオリゴマーで処理するとその細胞増殖が抑制される (特開平9-104627号公報) ことなどから、WT1遺伝子は白血病細胞の増殖に促進的に働いていることが示唆されている。さらに、WT1遺伝子は、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌においても高発現しており (特願平9-191635)、WT1遺伝子は白血病及び固形癌における新しい腫瘍マーカーであることが判明した。しかしながら、WT1遺伝子発現生成物が癌ワクチンとして有用な癌特異抗原であることは立証されていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

従って本発明は、WT1遺伝子発現生成物が癌抗原である可能性を確認し、新規な癌抗原を提供しようとするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、WT1遺伝子の発現生成物のアミノ酸配列中で、マウス及びヒトのMHCクラスI及びMHCクラスIIとの結合において、アンカーアミノ酸として機能すると予想される少なくとも1個のアミノ酸を含有する連続する7～30個のアミノ酸から成るポリペプチドを合成し、これらのペプチドがMHC蛋白質と結合することを確認すると共に、MHCクラスI抗原と結合した場合にキラーT細胞を誘導し、且つ標的細胞に殺細胞効果を及ぼすことを確認して本発明を完成した。

【0009】

従って本発明は、マウスWT1発現産物、又はその部分を含んで成る癌抗原を提供する。好ましい態様において、本発明は、WT1のcDNAに対応する配列番号：1に示すアミノ酸配列において、MHC抗原との結合のためのアンカーアミノ酸として機能すると推定されるPhe, Tyr, Leu, Met, Asn及びIleから成る群から選択される少なくとも1個のアミノ酸を含む6～30個のアミノ酸から成るペプチドを活性成分とする癌抗原を提供する。

【0010】

さらに、本発明は、ヒトWT1のcDNAに対応する配列番号：2に示すアミノ酸配列において、MHC抗原との結合のためのアンカーアミノ酸として機能する推定されるMet, Leu及びValから成る群から選択される少なくとも1個のアミノ酸を含む7～30個のアミノ酸から成るペプチドを活性成分とする癌抗原を提供する。

本発明はまた、上記の癌抗原を含んで成る癌ワクチンを提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明においては、癌抗原ペプチドを設計する際の基礎として、マウスMHCクラスIのK^b及びD^b、並びにヒトHLAのA0201を選択し、これらと高い親和性を有すると予想されるペプチドを選択した。

Immunogenetics Vol.41, p.178-228 (1995) の記載から、K^bへの結合のアンカーアミノ酸として5番目のPhe及びTyr並びに8番目のLeu及びMet等が予想され、またD^bへの結合のアンカーアミノ酸として5番目のAsn並び

に9番目のMet及びIle等が予想される。

【0012】

また、癌細胞の表面においてMHCクラスIにより提示される癌抗原ペプチドのサイズはおよそ8～12個であることが知られている。従って、本発明の癌抗原ペプチドは、配列番号：1に示すWT1遺伝子産物のアミノ酸配列において、Phe, Tyr, Leu, Met, Asn及びIleの少なくとも1個を含む、連続する7～30個のアミノ酸から成るペプチドである。アミノ酸の数は好ましくは8～12個であり、例えば8又は9個である。

【0013】

本発明においては、その具体例として、MHCクラスIのK^bに結合するペプチドとして、アミノ酸8個からなる下記ペプチド：

K^b 45 Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu (配列番号：3)

K^b 330 Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu (配列番号：4)

MHCクラスIのD^bに結合するペプチドとして、アミノ酸9個から成る下記のペプチド：

D^b 126 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：5)

D^b 221 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met (配列番号：6)

D^b 235 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：7)

を使用した。上記配列において下線を付したアミノ酸がアンカーとして機能すると予想されるアミノ酸である。

【0014】

次に、これらのペプチドの内、K^b 45及びK^b 330についてはMHCクラスIのK^bとの結合性を、D^b 126, D^b 221及びD^b 235についてはMHCクラスIのD^bとの結合性を、抗原ペプチドを提示していないが(empty)、K^b及びD^bは発現されているセルライン(RMA-S)を用いて測定した。

すなわち、RMA-Sを26℃にて培養してMHCクラスIを高発現せしめ、この培養細胞を被験ペプチド溶液と37℃にて1時間インキュベートした。これにより、ペプチドと結合しないMHC分子は不安定になって細胞表面から消失し、ペプチドを結合したMHCクラスI分子のみが残る。次に、MHCクラスI (

K^b, D^b) を認識する蛍光標識モノクローナル抗体によりRMA-S細胞を染色した。最後に、FACS解析により、細胞当りの平均蛍光量から結合解離定数を計算した (Immunol. Lett., 47, 1, 1995)。

【0015】

その結果、次の結果が得られた。

K ^b 45	-4. 5784838 (log)
K ^b 330	-5. 7617732
D ^b 126	-6. 2834968
D ^b 221	-5. 7545398
D ^b 235	-6. 1457624

以上の通り、いずれもK^b 又はD^b と強～中程度の結合親和性(kd値)を有しているが、最も高い結合親和性を示すD^b 126 ペプチドを以後の実験において用いた。

【0016】

また、ヒトについては、Immunogenetics Vol. 41, p. 178-228 (1995) の記載から、ヒトのHLA-A0201への結合アンカーアミノ酸として、N-末端から2番目のLeu及びMet、並びにN-末端から9番目のVal及びLeuが予想される。そこで、ヒトWT1蛋白質のアミノ酸配列 (Mol. Cell. Biol. Vol. 11, p. 1707-1712, 1991) (配列番号: 2) 中で、上の条件に合致する、9個のアミノ酸から成る2種類のペプチドを合成した。

【0017】

D^b 126; Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号: 5)

(マウスにおけるD^b 126 の配列と同じ)

WH 187; Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (配列番号: 8)

(下線はアンカーアミノ酸を示す。)

上記ペプチドと、HLA-A0201との結合能を次のようにして測定した。

上記ペプチドと、emptyなHLA-A*0201をもつT2細胞 (J. Immunol., 150, 1763, 1993; Blood, 88, 2450, 1996)を37℃、1時間インキュベート後、HLA-A2を認識する蛍光標識モノクローナル抗体で、T2細胞を染

色し、FACS解析で、細胞当りの平均蛍光量から結合解離定数を計算した。

【0018】

結 合 能	
ペプチド	K _d (M)
D ^b 126	1.89×10^{-6}
WH 187	7.61×10^{-6}

2種類のペプチドは、ともに中等度以上の結合親和性を有する。

ヒトMHCに対応するペプチドとして、上記D^b 126 及びWH 187を用いて、以下の実験を行った。

【0019】

本発明はまた前記抗原を有効成分とする癌ワクチンに関する。このワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液の癌、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防又は治療のために使用することができる。このワクチンは、経口投与、又は非経口投与、例えば腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、静脈内投与、鼻腔内投与等により投与することができる。

【0020】

ワクチンは、前記有効成分としての投与ペプチドのほかに、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバンド、例えば水酸化アルミニウムのごとき鉱物ゲル；リソレシチン、プルロニックポリオールのごとき界面活性剤；ポリアニオン；ペプチド；又は油乳濁液を含むことができる。あるいは、リポソーム中へ混合し、又は多糖及び／又はワクチン中に配合される他の集合体を含むことができる。投与量は一般に、1日当り0.1 μ g ~ 1 mg/kgである。

【0021】

【実施例】

次に、実施例により、本発明のペプチドが癌抗原及び癌ワクチンとして有用なことを、明らかにする。

実施例 1

D^b 126 ペプチド 100 μ g、ブタ由来の乳酸脱水素酵素 (LDH) 200 μ g、及びフロイントの不完全アジュバント 0.5 ml を C57BL/6 マウスの腹腔内に、1 週毎に 2 回注射して免疫処理した。この免疫処理の 1 週間後にマウスの脾臓を摘出し、脾臓細胞の浮遊液を調製した。他方、D^b 126 ペプチドをパルスした同系マウスの放射線照射脾細胞を、ペプチド 50 μ g/ml を含む溶液と 37℃ にて 30 分間インキュベートし、抗原提示細胞とした。

【0022】

前記の免疫処理した脾細胞と放射線照射した脾細胞を混合して、5 日間共培養し、キラー T-細胞を誘導調製した。他方 D^b 126 ペプチドによりパルス (100 μ g/ml のペプチド溶液と 37℃ にて 30 分間インキュベート) した Euromium ラベル EL-4 細胞 (K^b 及び D^b を発現している) を標的細胞とし、通常の方法を用いて、次の操作により Killing アッセイを行った (表 1)。

その結果、D^b 126 をパルスした EL-4 細胞を標的にした場合は、殺細胞効果が見られたが、D^b 126 をパルスしていない EL-4 細胞標的した場合は、殺細胞効果はほとんど見られなかった。

【0023】

【表 1】

表 1

	マウス A	マウス B
ペプチド+	76.6 %	37.2 %
ペプチド-	4.9 %	0.9 %

E/T 比 40 : 1

【0024】

次に、Killing アッセイにより有意な殺細胞効果を示した脾細胞試料を

、蛍光標識した抗CD4抗体又は抗CD8抗体で染色しフローサイトメトリーにより、CD4及びCD8の発現を解析した。

その結果、図1に示すごとく、非免疫対照細胞に比べて、D^b126 ペプチドで免疫処理した脾細胞においては、キラーT-細胞により代表されるCD8⁺細胞が増加し、ヘルパーT-細胞等により代表されるCD4⁺細胞に対するCD8⁺細胞の比率が逆転増加していた。

【0025】

実施例2

C57BL/6マウスの骨髓由来の樹状細胞 (dendritic cells ; DC) を次の様にして調製した。常法に従い、骨髓細胞をGM-CSF存在下で培養し、骨髓由来樹状細胞を調製した (J. Exp. Med. 182, 255, 1995)。

7日間培養した樹状細胞と10 μ MのOVAII (Ovalbumin II) 及び1 μ MのD^b126 ペプチドと共に3時間インキュベートした後、洗浄した。

【0026】

次に、C57BL/6マウスのfoot padsとhandsとに上記DC細胞を皮内注射し、5日目に所属リンパ節を取り出し、細胞浮遊液を調製した。他方、D^b126 ペプチドでパルスし、放射線照射したB7.1-RMA-S細胞 (Co-stimulatory moleculeであるB7.1をコードする遺伝子をトランスフェクトしたRMA-S細胞) を調製した。

【0027】

次に、上記のリンパ節由来細胞浮遊液とB7.1-RMA-S細胞とを混合して培養することによりインビトロで再刺激した。

次に、インビトロでの再刺激の5日目に、⁵¹CrでラベルしたRMA-S細胞を標的としてKillingアッセイを行った。再刺激5日目に回収されたリンパ球全体の1/8をエフェクター細胞として用いた時を、最大のE/T比 (1.0) とした。

【0028】

図2及び図3に示すごとく、D^b126 ペプチドにより免疫された細胞は、該ペプチドでパルスされた標的細胞を殺したのに対して、該ペプチドでパルスされな

い標的細胞は殺さなかった。

また、実施例1と同様にして行ったフローサイトメトリーで $CD4^+$ 細胞と $CD8^+$ 細胞の比を解析したところ、 $CD4:CD8=1:1.4\sim 1.7$ であり、非免疫マウス細胞（対照）に比べて、 D^b_{126} ペプチドで免疫されたマウス細胞においては、 $CD8^+$ 細胞が増加し、 $CD4^+$ 細胞： $CD8^+$ 細胞の比（対照細胞においては約2：1）が免疫された細胞においては逆転していた。

【0029】

実施例3

ペプチド D^b_{126} 又はWH 187 ($40\mu g/ml$)と1時間インキュベートした後に放射線照射したT2細胞 5×10^4 個とHLA-A*0201をもつ健常人の末梢単核球 1×10^6 個とを共培養した。一週間後、ペプチド ($20\mu g/ml$)と1時間インキュベートした後に放射線照射したT2細胞を上記の共培養系に加え、再刺激を行なった。その翌日から、human IL-2（最終濃度100 JRU/ml）を培養液に加えた。

【0030】

以後、ペプチドでパルス後に放射線照射されたT2細胞での刺激を5回くり返した後、ペプチドをパルスされたT2細胞、あるいは、ペプチドをパルスされていないT2細胞を標的にして、Killing assayを行なった。また、誘導されたCTLの表面マーカーをFACS解析した。

Killing assayは常法に従いEuropiumでラベルしたT2細胞にペプチドをパルスしたものを標的として行った。

Effector:Target比 (E/T ratio) は10:1

共培養時間: 3時間

培養液中のペプチド濃度: $5\mu g/ml$

【0031】

結果を図4に示す。図4のAは D^b_{126} ペプチドを用いて誘導したCTLの、 D^b_{126} ペプチドをパルスしたT2細胞に対する殺細胞効果を示し、図4のBはWH 187ペプチドを用いて誘導したCTLの、WH 187ペプチドをパルスしたT2細胞に対する殺細胞効果を示す。

いずれの場合でも、ペプチドをパルスした T2 細胞に対してより強い殺細胞効果が見られた。

【0032】

FACS 解析の結果を図 5～図 10 に示す。図 5～7 に D^b 126 ペプチドで誘導した CTL の結果を示し、ほとんどの細胞が CD8 陽性であった。図 8～図 10 は WH 187 ペプチドで誘導された CTL の結果を示す。CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞がほぼ同数であった。

上記の結果から、本発明のペプチドは確かに癌抗原として機能し、癌細胞に対するキラー T 細胞（癌細胞傷害性 T 細胞）を誘導増殖させたことが立証された。従って、本発明の癌抗原ペプチドは、WT1 遺伝子の発現の上昇を伴う白血病及び固形癌に対する癌ワクチンとして有用である。

【0033】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>

<120> Cancer Antigen Based on Tumor Suppressor Gene WT1

<130> 983279

<160> 8

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Ser

5

10

15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly Leu Pro Val Ser Gly Ala

20

25

30

Arg Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala

35

40

45

Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro

50

55

60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly

65

70

75

80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Leu His Phe

85

90

95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe

100

105

110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe

115

120

125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Thr Ile
 130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Ala Pro Ser Tyr
 145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Gln His Ser Phe
 165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Met Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Gly Ile Gly Tyr Glu
 260 265 270

Ser Glu Asn His Thr Ala Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Ser
 290 295 300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp

355

360

365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln

370

375

380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr

385

390

395

400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys

405

410

415

Arg Trp His Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val

420

425

430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu His Val Ala

435

440

445

Leu

449

[0 0 3 4]

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 4 4 9

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > H u m a n

< 4 0 0 > 2

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro

5

10

15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala

20

25

30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr

35

40

45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro

50

55

60

Pro	Pro	Pro	Pro	His	Ser	Phe	Ile	Lys	Gln	Glu	Pro	Ser	Trp	Gly	Gly
65						70								75	80
Ala	Glu	Pro	His	Glu	Glu	Gln	Cys	Leu	Ser	Ala	Phe	Thr	Val	His	Phe
				85						90					95
Ser	Gly	Gln	Phe	Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Cys	Arg	Tyr	Gly	Pro	Phe
				100					105					110	
Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Gln	Ala	Arg	Met	Phe
				115					120					125	
Pro	Asn	Ala	Pro	Tyr	Leu	Pro	Ser	Cys	Leu	Glu	Ser	Gln	Pro	Ala	Ile
				130					135					140	
Arg	Asn	Gln	Gly	Tyr	Ser	Thr	Val	Thr	Phe	Asp	Gly	Thr	Pro	Ser	Tyr
145							150				155				160
Gly	His	Thr	Pro	Ser	His	His	Ala	Ala	Gln	Phe	Pro	Gln	His	Ser	Phe
							165				170				175
Lys	His	Glu	Asp	Pro	Met	Gly	Gln	Gln	Gly	Ser	Leu	Gly	Glu	Gln	Gln
				180					185					190	
Tyr	Ser	Val	Pro	Pro	Pro	Val	Tyr	Gly	Cys	His	Thr	Pro	Thr	Asp	Ser
				195					200					205	
Cys	Thr	Gly	Ser	Gln	Ala	Leu	Leu	Leu	Arg	Thr	Pro	Tyr	Ser	Ser	Asp
				210					215					220	
Asn	Leu	Tyr	Gln	Met	Thr	Ser	Gln	Leu	Glu	Cys	Met	Thr	Trp	Asn	Gln
225							230					235			240
Met	Asn	Leu	Gly	Ala	Thr	Leu	Lys	Gly	Val	Ala	Ala	Gly	Ser	Ser	Ser
							245					250			255
Ser	Val	Lys	Trp	Thr	Glu	Gly	Gln	Ser	Asn	His	Ser	Thr	Gly	Tyr	Glu
							260					265			270
Ser	Asp	Asn	His	Thr	Thr	Pro	Ile	Leu	Cys	Gly	Ala	Gln	Tyr	Arg	Ile
							275					280			285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 290 295 300
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415
 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
 435 440 445
 Leu
 449

[0035]

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 3

Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu

1 5

[0036]

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 4

Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu

1 5

[0037]

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 5

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

[0038]

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 6

Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met

1 5

【0039】

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 7

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1 5

【0040】

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 8

Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、実施例1における、 D^b_{126} ペプチドで免疫した細胞と非免疫細胞のフローサイトメトリーにおける $CD4^+$ 細胞と $CD8^+$ 細胞の比率を示すグラフである。

【図2】

図2は、実施例2における、 D^b_{126} ペプチドにより免疫した細胞の、 D^b_{126} ペプチドで処理した標的細胞と未処理の標的細胞に対する殺細胞作用を比較したグラフである。

【図3】

図3は、図2と同じ意味のグラフである。

【図4】

図4において、Aは、実施例3における、 D^b_{126} ペプチドを用いて誘導したCTLの、 D^b_{126} ペプチドをパルスしたT2細胞に対する殺細胞効果を示し、Bは実施例3における、WH 187ペプチドを用いて誘導したCTLの、WH 187ペプチドをパルスしたT2細胞に対する殺細胞効果を示すグラフである。

【図5】

図5は、 D^b_{126} ペプチドにより誘導されたCTLの表面マーカーをFACSにより解析した結果を示すチャートである（CD19細胞及びCD3細胞）。

【図6】

図6は、CD4細胞及びCD8細胞についての、図5と同様のチャートである。

【図7】

図7は、CD56細胞についての図5と同様のチャートである。

【図8】

図8は、WH 187ペプチドにより誘導したCTLの表面マーカーをFACSにより解析した結果を示すチャートである（CD19細胞及びCD3細胞）。

【図9】

図9は、CD4細胞及びCD8細胞についての、図8と同様のチャートである。

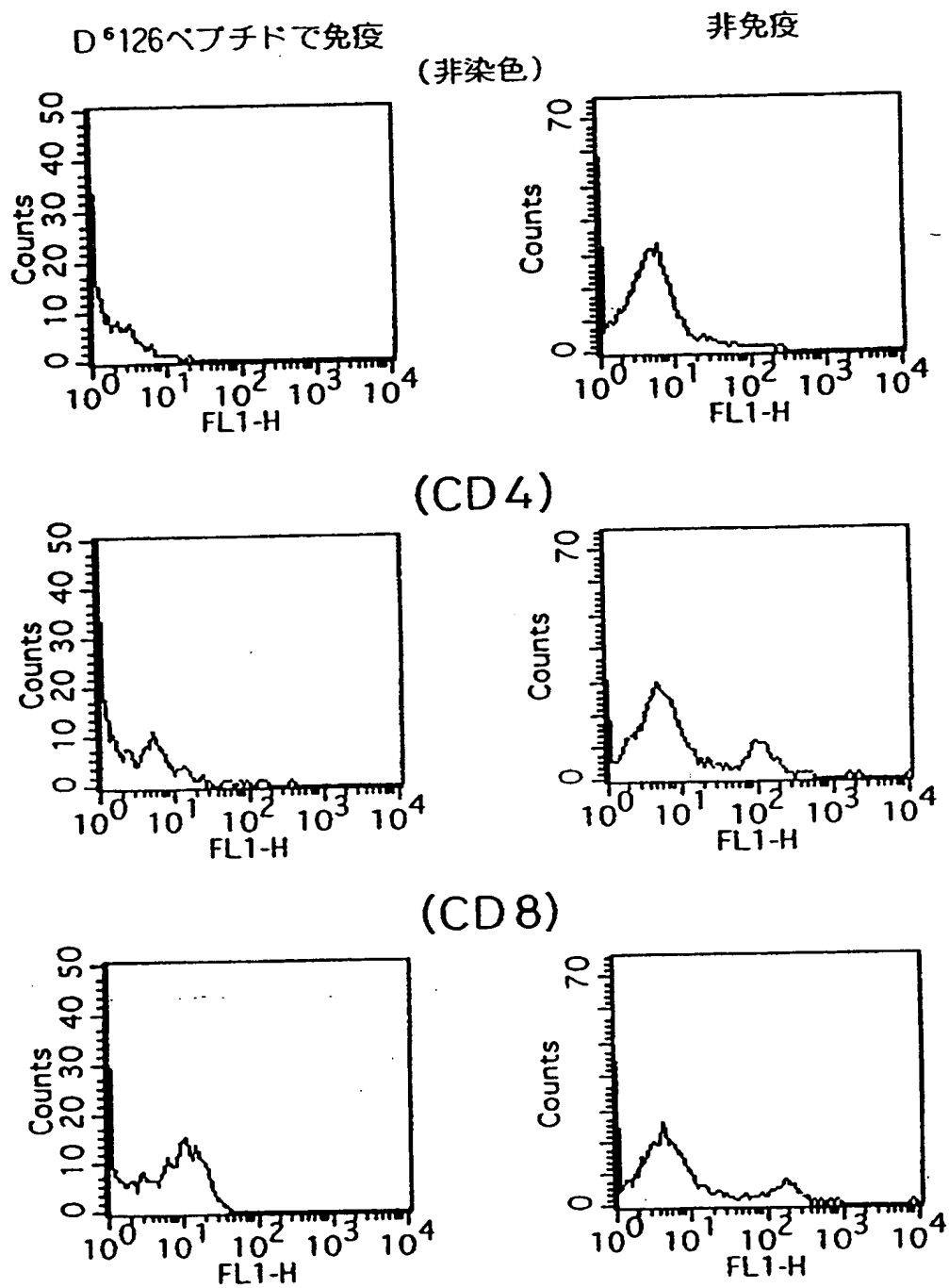
【図 10】

図 10 は、CD 56 細胞についての、図 8 と同様のチャートである。

【書類名】 図面

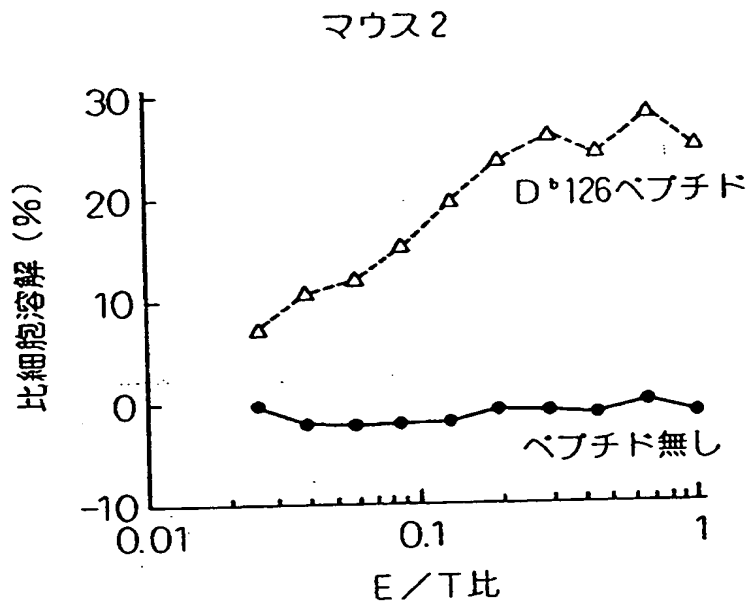
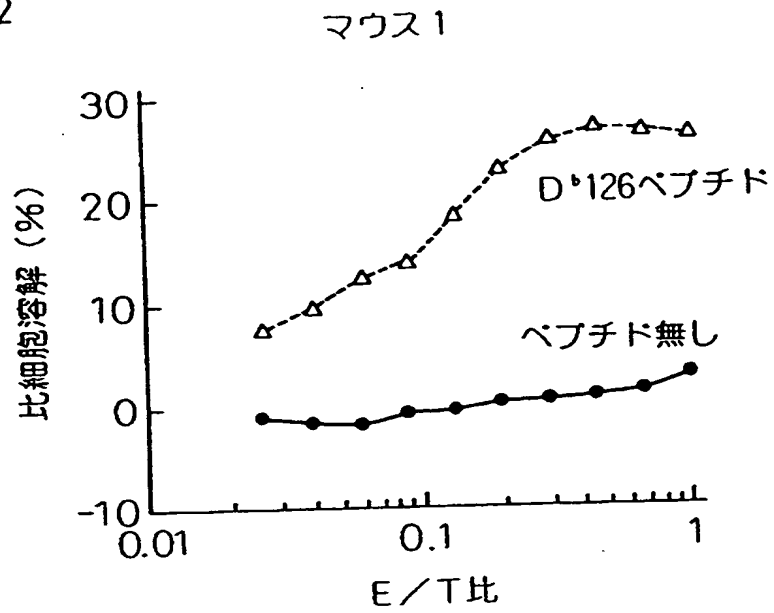
【図1】

図1



【図2】

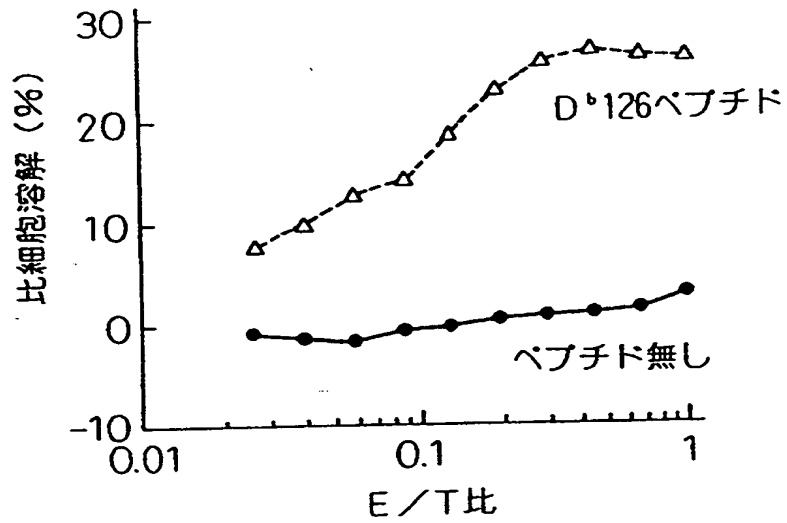
図2



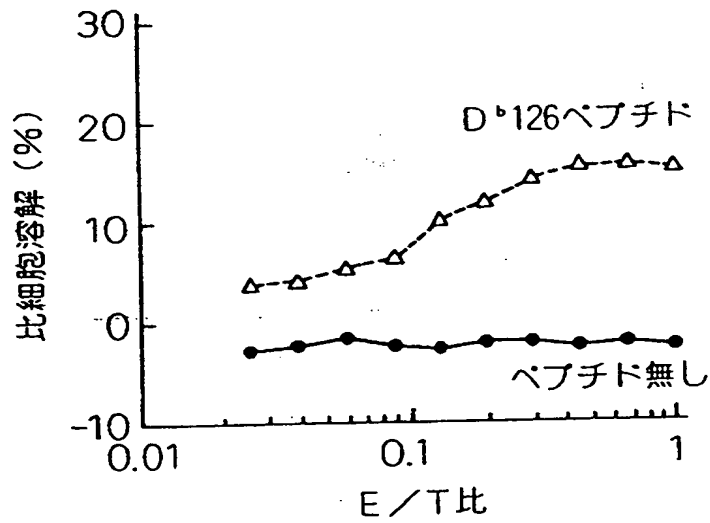
【図3】

図3

マウス3

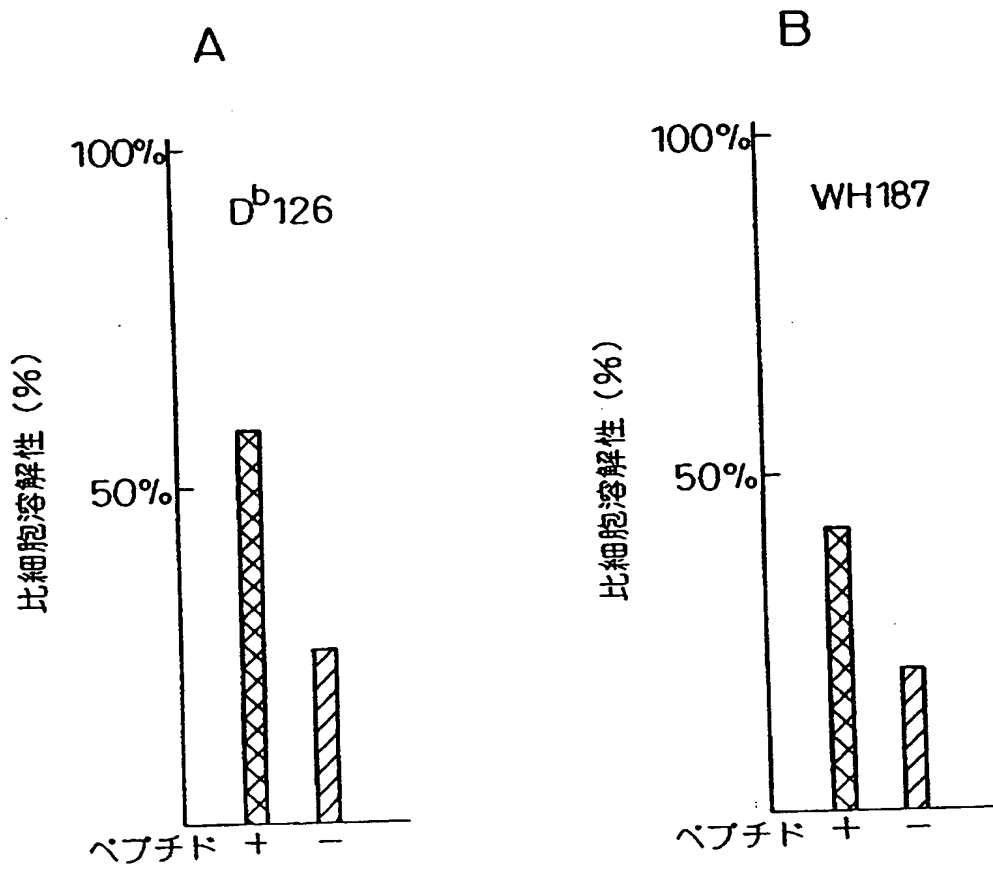


マウス4



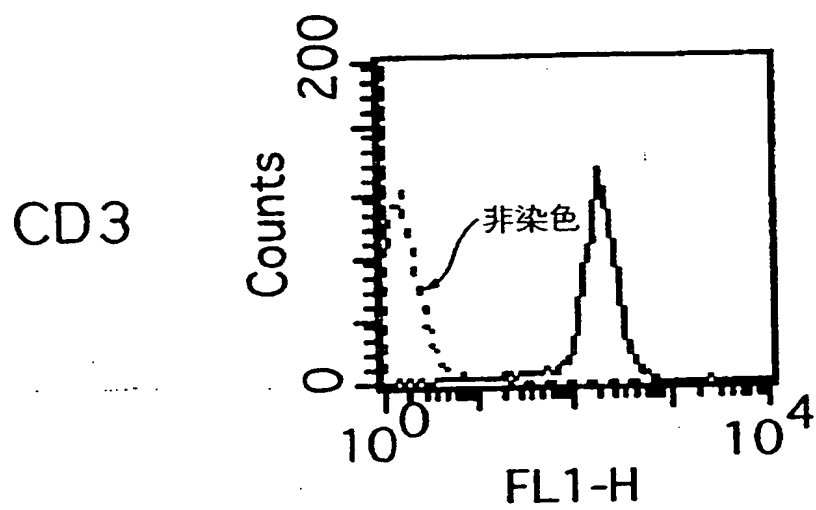
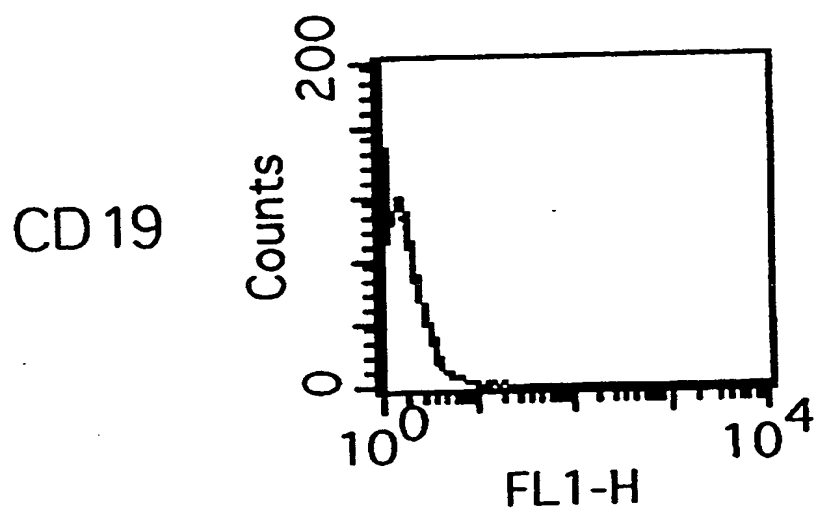
【図 4】

図 4



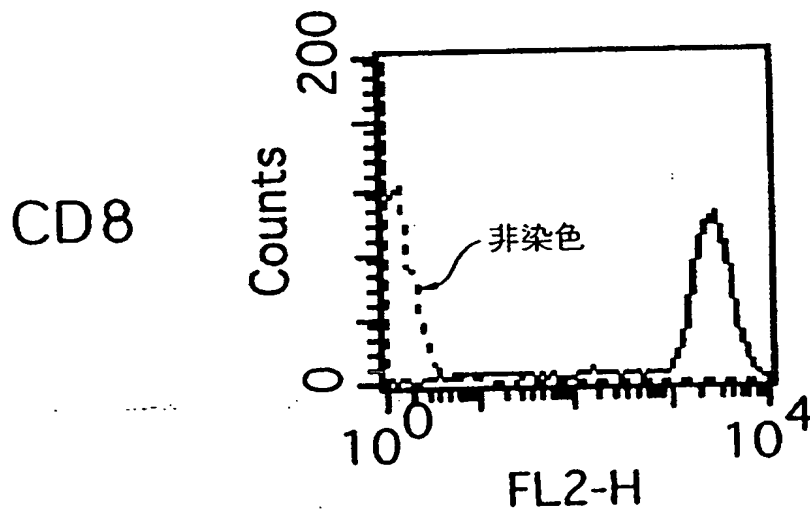
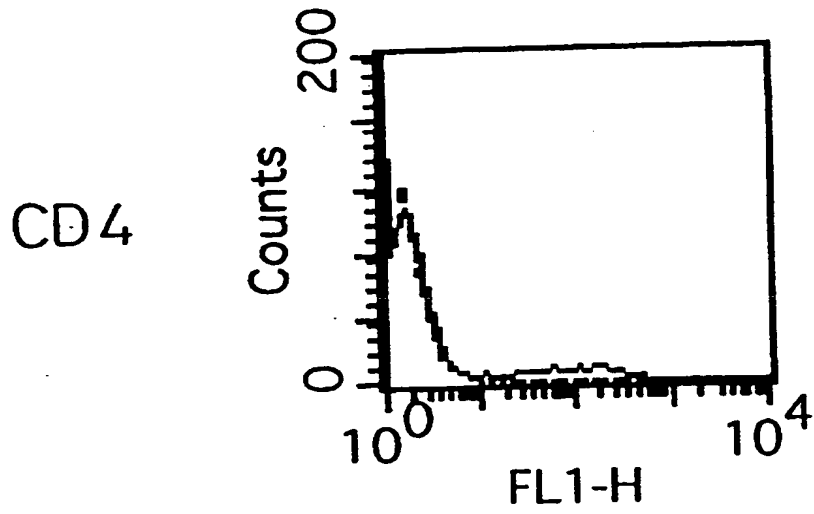
【図5】

図5



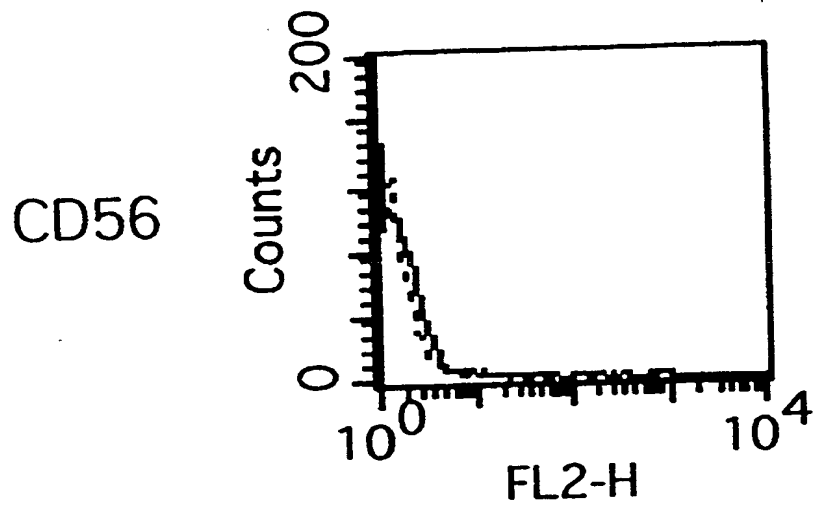
【図6】

図6



【図7】

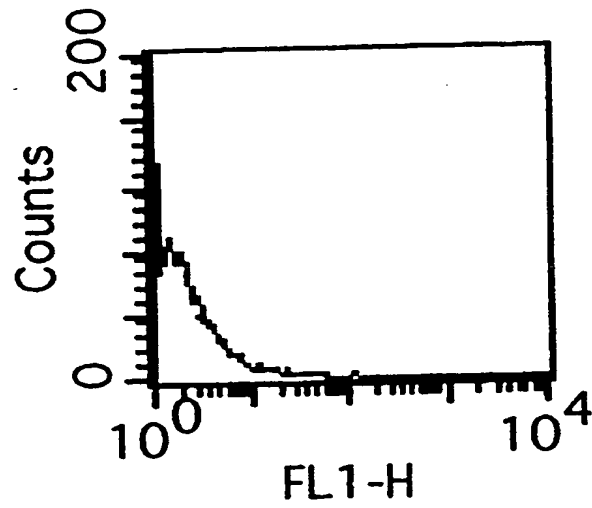
図7



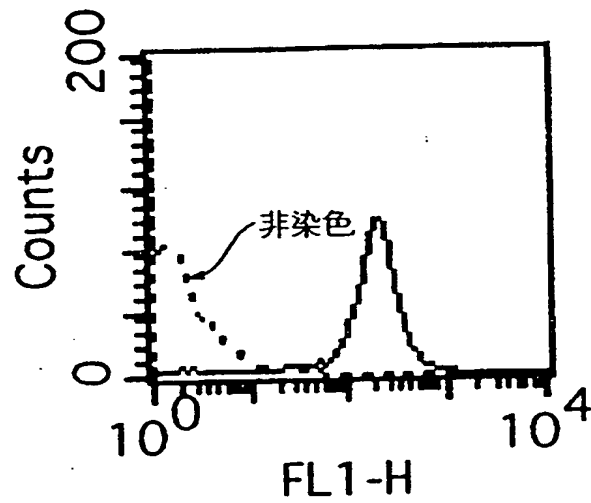
【図8】

図8

CD19

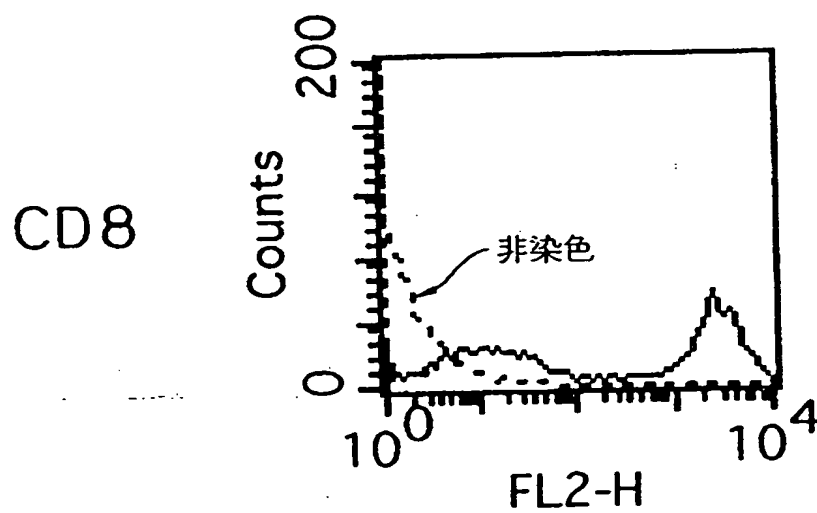
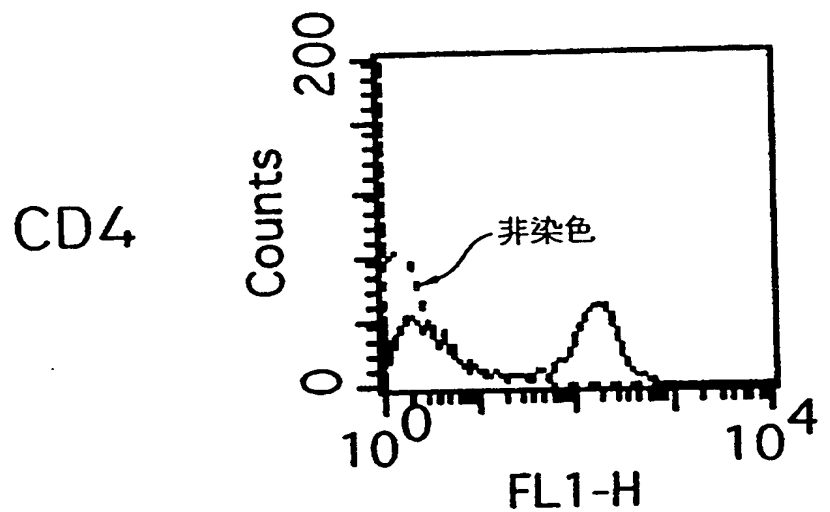


CD3



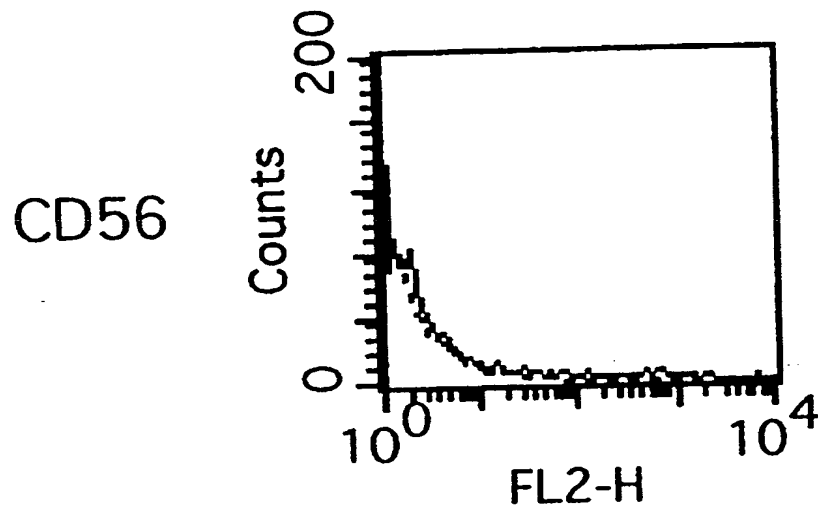
【図9】

図9



【図 10】

図10



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な癌抗原の提供。

【解決手段】 W i l m s 腫瘍抑制遺伝子 W T 1 の産物、又は該アミノ酸配列中、主要組織適合性抗体 (MHC) クラス I との結合のアンカーアミノ酸を含む連続する 7 ～ 15 個のアミノ酸から成るペプチドを有効成分とする癌抗原、及びそれを含む癌ワクチン。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 595090392
【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西2-19-30
【氏名又は名称】 杉山 治夫

【代理人】 申請人

【識別番号】 100077517
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】 石田 敬

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100088269
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】 西山 雅也

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595090392]

1. 変更年月日	1995年 6月 1日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府箕面市船場西2-19-30
氏 名	杉山 治夫